

| 発表者氏名 | 論文タイトル名 | 発表誌名 | 巻号 | ページ | 出版年 |
|--|--|---------------------|--------|-----------|------|
| 虫本雄一, 竹谷健, 長谷川有紀, 小林弘典, 福井徹, 渡邊敏明, 山口清次 | ステロイド抵抗性の難治性アトピー性皮膚炎として加療されていたビオチン欠乏の1例 | アレルギーの臨床 | 30(6) | 543-547 | 2010 |
| 顧艶紅, 小林弘典, 加藤忠明, 長谷川有紀, 原田正平, 山口清次 | Two-source capture recapture method を用いた日本におけるメチルマロン酸血症の発症率及び小児慢性特定疾患治療研究事業での登録率の検討 | 日本マス・スクリーニング学会誌 | 20(1) | 33-37 | 2010 |
| 栗野宏之, 八木麻理子, 起塚庸, 小林弘典, 長谷川有紀, 山口清次, 坂本修, 大浦敏博, 竹島泰弘, 松尾雅文 | 幼児期に繰り返す嘔吐発作で発症したメチルマロン酸血症の同胞例 | 日本小児科学会雑誌 | 114(6) | 961-965 | 2010 |
| 小林弘典, 山口清次 | タンデムマスによる新生児マススクリーニング | 小児科 | 51(12) | 1697-1703 | 2010 |
| Y. Vachutinsky, K. Kataoka, et al. | Antiangiogenic gene therapy of experimental pancreatic tumor by sFlt-1 plasmid DNA carried by RGD-modified crosslinked polyplex micelles. | J. Control. Release | 149 | 51-57 | 2011 |
| M. Oba, K. Kataoka, et al. | Polyplex micelles prepared from ω -cholesteryl PEG-polycation block copolymers for systemic gene delivery. | Biomaterials | 32 | 652-663 | 2011 |
| H.-J. Kim, K. Kataoka, et al. | Introduction of stearyl moieties into a biocompatible cationic polyaspartamide derivative, PAsp(DET), with endosomal escaping function for enhanced siRNA-mediated gene knockdown. | J. Control. Release | 145 | 141-148 | 2010 |
| K. Itaka, K. Kataoka, et al. | Biodegradable polyamino acid-based polycations as safe and effective gene carrier minimizing cumulative toxicity. | Biomaterials | 31 | 3707-3714 | 2010 |
| M. Oba, K. Kataoka, et al. | Antiangiogenic gene therapy of solid tumor by systemic injection of polyplex micelles loading plasmid DNA encoding soluble Flt-1. | Mol. Pharm. | 7 | 501-509 | 2010 |

IV. 研究成果の刊行物・別刷


まずは診断しなくては

臨床症状からの
診断手順

新生児マススクリーニングで異常になったとき

山口清次

新生児マススクリーニングは、知らずに放置すると重大な障害をきたす疾患を新生児期の発症前に見つけ、早期介入して障害発生を予防する事業である。わが国では、1977（昭和52）年から全国実施され、これまでに1万人以上の小児が障害から免れたといわれている¹⁾。

現在、に示すような6疾患を対象に事業が行われている。マススクリーニングで異常が見つかったとき、各自治体検査センターから出産施設（産科または小児科）に連絡される。典型的な異常の場合、ただちに保健所に相談して指定医療機関と連絡をとり、診断・治療を依頼する。

異常値が境界線上にあり新生児になら症状のないとき、再検査等によってデータの再現性が確認できれば地域の指定医療機関に紹介する。

現行のマススクリーニング対象疾患とタンデムマス導入で新たに加わる主な対象疾患

| | 対象疾患 | 主な臨床症状 | 発見頻度 ¹⁾ |
|------------------------------------|-----------------------------|------------|--------------------|
| 現行の 対象疾患 | 1. 先天性甲状腺機能低下症 | 発達遅滞 | 1:3千 |
| | 2. 先天性副腎過形成症 | ショック | 1:2万 |
| | 3. ガラクトース血症（I型） | 肝不全、白内障 | 1:90万 |
| | 4. フェニルケトン尿症 ^{*2} | けいれん、発達遅滞 | 1:6万 |
| | 5. メーブルシロップ尿症 ^{*2} | アシドーシス | 1:50万 |
| | 6. ホモシスチン尿症 ^{*2} | 精神遅滞、発育異常 | 1:80万 |
| タンデム マス で 発見 できる 疾患 | ^{*2} 上記の4, 5, 6も対象 | | |
| | 7. 高チロシン血症I型 | 肝・腎不全 | — |
| | 8. シトルリン血症（I型） | 高アンモニア血症 | 1:40万 |
| | 9. アルギニノコハク酸血症 | 高アンモニア血症 | 1:80万 |
| | 10. メチルマロン酸血症 | アシドーシス | 1:11万 |
| | 11. プロピオン酸血症 | アシドーシス | 1:4万 |
| | 12. β-ケトチオラーゼ欠損症 | ケトーシス発作 | — |
| | 13. イソ吉草酸血症 | アシドーシス、体臭 | 1:40万 |
| | 14. メチルクロトニルグリシン尿症 | 筋緊張低下、急性脳症 | 1:13万 |
| | 15. マルチブルカルボキシラーゼ欠損症 | 湿疹、高乳酸血症 | 1:40万 |
| | 16. ヒドロキシメチルグルタル酸血症 | 低血糖発作、突然死 | — |
| | 17. グルタル酸血症I型 | アデトーゼ、精神遅滞 | 1:20万 |
| | 18. グルタル酸血症II型 | 急性脳症 | 1:16万 |
| | 19. MCAD欠損症 | SIDS、急性脳症 | 1:13万 |
| | 20. SCHAD欠損症 | 高インスリン血症 | 1:80万 |
| | 21. VLCAD欠損症 | 低血糖、筋肉、心障害 | 1:20万 |
| | 22. TFP/LCHAD欠損症 | 急性脳症、筋肉症状 | — |
| | 23. CPT I欠損症 | 急性脳症、肝障害 | 1:27万 |
| | 24. CPT II欠損症 | 肝不全、筋肉症状 | 1:30万 |
| | 25. TRANS欠損症 | SIDS、急性脳症 | — |
| 26. 全身性カルニチン欠乏症 | SIDS、急性脳症 | 1:20万 | |

MCAD: medium chain acyl-CoA dehydrogenase (中鎖アシル CoA デヒドロゲナーゼ)

SCHAD: short chain 3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase (短鎖3-ヒドロキシアシル CoA デヒドロゲナーゼ)

VLCAD: very long chain acyl-CoA dehydrogenase (極長鎖アシル CoA デヒドロゲナーゼ)

TFP: trifunctional protein (三頭酵素(ヒト脂肪酸β酸化酵素複合体))

LCHAD: long chain 3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase (長鎖3-ヒドロキシアシル CoA デヒドロゲナーゼ)

CPT: carnitine palmitoyltransferase (カルニチンパルミトイルトランスフェラーゼ)

TRANS: carnitine acylcarnitine translocase (カルニチンアシルカルニチントランスロカーゼ)

SIDS: sudden infant death syndrome (乳幼児突然死症候群)

*1: 発見頻度: 1~3以外は2008年時点のタンデムマス・パイロット研究の結果。
*2: タンデムマスでも発見できる疾患。

先天性甲状腺機能低下症

血中TSH高値（通常10μU/mL以上）、およびFT₄低下（1.0ng/dL以下）が認められたとき、専門医療機関に紹介する。一過性甲状腺機能低下症を含む重型の鑑別が行われる。治療はレボチロキシナトリウム（チラーヂン®）の経口投与である。

TSH: thyroid stimulating hormone (甲状腺刺激ホルモン)

FT₄: free thyroxine (遊離サイロキシン)

先天性腎形器症

新生児期からショックなどが急性発症する可能性があるため、診断と並行して治療が進められなければならない。専門医療機関との連携を急ぐ必要がある。代表的な治療としてヒドロコルチゾン、フルドロコルチゾン（フロリネフ®）の投与と、塩喪失型では塩分補給が行われる。

ガラクトース血症

先天性酵素異常による病型（Ⅰ型、Ⅱ型）はきわめてまれである。血中ガラクトース高値を示す例の頻度は約3万人に1人であるが、大部分が門脈形成異常、一過性、原因不明の例である。

酵素欠損によるガラクトース血症Ⅰ型では、早期に肝不全が起こり、Ⅱ型では若年性白内障となる。ガラクトース高値が指摘されたら、ただちに乳糖を含まない人工乳（ボンラクト（i）®、ラクトレス®、ソーヤミール®など）に切り替えて専門医療機関に紹介する。

PKU: phenylketonuria (フェニルケトン尿症)

Phe: phenylalanine

BH₄: tetrahydrobiopterin (テトラヒドロビオプテリン)

フェニルアラニン代謝症 (PKU)

血中フェニルアラニン (Phe) 値が20mg/dL以上ならばPKUの疑い濃厚なのでただちに専門機関に紹介する。Phe 10~20mg/dLを高フェニルアラニン血症という。再検し再現性があれば専門医療機関に紹介する。治療用ミルクによる食事療法が開始され、BH₄反応性が確認されればBH₄が投与される。悪性高フェニルアラニン血症*1と判明すれば(5%以下)、BH₄、L-dopa カルビドパ、5-ヒドロキシトリプトファンが投与される。食事療法のための治療用特殊ミルクが用意されている*2。

*1 悪性高フェニルアラニン血症

フェニルケトン尿症の欠損酵素であるフェニルアラニンヒドロキシラーゼ (PAH) そのものに異常はなく、補酵素であるBH₄の代謝障害が原因である。BH₄はトリプトファンからドーパミンを生成する経路、トリプトファンからセロトニンを生成する経路にも補酵素として働くため、神経伝達物質の欠乏を伴う。このためこの病型では、低Phe食事療法だけでは改善せず、BH₄補充とL-dopaおよび5-ヒドロキシトリプトファンを投与する必要がある。

PAH: phenylalanine hydroxylase (フェニルアラニンヒドロキシラーゼ)

メチオニン代謝症

早期発症重症型から軽症型まである。発症すると生命にかかわる可能性があるため、できるだけ早く専門医療機関に紹介する。治療は、治療用特殊ミルクによる食事療法、チアミン投与などが行われる。

*2 特殊ミルク事務局連絡先
社会福祉法人恩賜財団母子愛育会総合母子保健センター研究開発部内
〒106-8530 東京都港区南麻布5-6-8

タンデムマス

Ⅰ型、Ⅱ型、Ⅲ型の病型のうち、Ⅰ型がマススクリーニングでメチオニン高値を示す。専門機関では、血中・尿中ホモシスチンを測定して診断が確定される。治療は食事療法、ビタミンB₆投与、ベタイン投与などである。

*3 タンデムマス
質量分析の一種である血液濾紙のパンチ一つを処理して分析するとアミノ酸、アシルカルニチンを高感度に分析できる。アミノ酸分析値はGuthrie法に比べ偽陽性、偽陰性率が一桁少ない。またアシルカルニチン分析によって有機酸・脂肪酸代謝異常をスクリーニングできる。



新生児マススクリーニングが変わろうとしている。タンデムマス*3を導入して、1回の検査で20種類以上の疾患（アミノ酸代謝異常を含む有機酸・脂肪酸代謝異常）を安価にスクリーニングする試みが進み、近い将来、タンデムマス・スクリーニングが全国実施されると思われる²⁾。

2009年時点で出生107万人のうち約23万人（約20%）の新生児がタンデ

ムマス検査を受けた。タンデムマス・スクリーニングで陽性になった場合、以下のように対応する³⁾。

確定診断

明らかな異常値が指摘されたら、ただちに専門機関に紹介する。検査値がボーダーラインの場合再検する。

しかし脂肪酸代謝異常の場合、生後日数が経つにつれて、病気であっても検査値が正常化する可能性があるので再検を繰り返すことは意味がないことを念頭におく。再検査する場合、血液濾紙でなく血清で検査する⁴⁾。

アミノ酸代謝異常が疑われる例ではアミノ酸分析、有機酸・脂肪酸代謝異常の疑われる例ではGC/MS^{*4)}による有機酸分析、血清アシルカルニチン^{*5)}分析（フリーカルニチンも評価する）、必要な場合酵素活性測定、遺伝子診断などによって確定診断が行われることがある。

治療

アミノ酸代謝異常：前述のように食事療法を中心とした治療を行う。

有機酸・脂肪酸代謝異常：食事療法、十分なエネルギー、L-カルニチン投与、ビタミンなど薬物療法、および生活指導^{*6)}、その他、MCT ミルクやコーンスターチ投与も行われることがある。

おわりに：稀少疾患の診療ネットワークについて

マススクリーニングで発見される疾患は稀少疾患である。とくにタンデムマスで見つかる疾患は、専門家でも経験したことがないものも少なくない。また確定診断のための検査を行える機関も現在のところ限られている。全国各地に検査機関を置いたり、専門家を配置することは不可能に近く、また無駄も多い。稀少疾患であるが、いつどこで発生するかわからない。

そこで、診断ネットワーク、診療コンサルトのネットワークを作り、日本中のどこからでも簡単にアクセスでき、一定の診療レベルを保証する体制が不可欠である。

また患者が発生したら、患者登録をセンター化して治療と転帰を検証することが、稀少疾患の治療法向上につながる。

参考文献

- 1) 成瀬 浩, 山口清次. 新生児スクリーニングの30年. 臨精医 2004; 33: 1453-60.
- 2) 山口清次. タンデムマスを導入した新生児マススクリーニングの新時代. 小児保健研 2006; 65: 725-32.
- 3) 北川照男ほか. タンデムマス導入にともなう新しい対象疾患の治療指針. 特殊ミルク情報 2006; 42: 28-53.
- 4) 虫本雄一ほか. 経過中血液ろ紙分析でカットオフを下回った極長鎖脂肪酸アシル-CoA 脱水酵素素欠損症2症例—血清分析の必要性. マス・スクリーニング会誌 2009; 19 (3) (印刷中).

*4

GC/MS

ガスクロマトグラフィーと質量分析のつながった分析機器である。非常に多種類の尿中有機酸を一斉分析できる。代謝プロフィールから代謝異常を化学診断できる。またタンデムマス・スクリーニングのあと、確認検査、治療判定などに有用である。

GC/MS: gas chromatography-mass spectrometry

*5

アシルカルニチン

有機酸・脂肪酸代謝異常で蓄積したアシル基にカルニチンが結合した代謝産物である。カルニチンを投与するとアシルカルニチンとして体外に排泄する作用があり、治療として応用される。また、タンデムマスによってアシルカルニチン分析をして、アシル基のプロフィールから代謝異常を化学診断できる。

*6

乳児期の食事間隔の指導、シックデいの対応など。

MCT: medium chain triglyceride (中鎖脂肪酸トリグリセリド)

2.

代謝性疾患

① 子どもの代謝の特徴と発達

① 子どもによくみられる代謝異常

代謝異常とは、体内の生化学反応のバランスがくずれて症状が出ることである。成人では糖尿病、高脂血症などが問題になる。一方小児では先天性と後天性の代謝異常がある。「先天性」は、酵素が生まれつき欠損しているために異常代謝産物が体内にたまったり、欠乏するために障害をきたす先天代謝異常である。「後天性」では、栄養の問題やホルモン、電解質バランスの異常のために代謝が乱れる疾患で、糖尿病、周期性嘔吐症の他、くる病、脚気などビタミン欠乏なども含まれる。

② 新生児マススクリーニング

① 新生児マススクリーニングとは

知らずに放置するとやがて障害の出てくるような先天代謝異常を、発症する前に見つけて治療を開始して障害発生を予防する事業である。わが国では昭和52年から全国実施されている。

② 新生児マススクリーニングの対象疾患の要件

早期発見が目的ではない。有効な治療法があること、検査が安価で費用対効果が良いこと、新生児に負担のかからない検査法であることなどの要件を満たさなければならない。

③ 新生児マススクリーニングの現状

わが国では現在6疾患を対象にしている。表2-1に示すように、先天性甲状腺機能低下症が最も頻度が高く、治療費も安価で治療効果も良好なので、便益性が良いと判定されている。一方非常に頻度が低いためスクリーニングの効果が必ずしも評価されていない疾患もある。

④ 新生児マススクリーニングの実際

生後5日前後に血液の測定などから採取して、ろ紙にある直径約1cm大のスポット(4つ)に血液をしみ込ませ、室温で十分乾燥させて、各自治体の指定した検査施設に郵送する。乾燥血液ろ紙から直径3mmのパンチを抜き取り、血液ろ紙パンチの中に含まれた成分を測定する。もしも異常が発見されたらすぐに医療機関に連絡して診断、治療が行われる。

⑤ 新生児マススクリーニングの今後の課題

対象疾患を増やしてより多くの子どもたちを障害発生から救おうという

表2-1 わが国で行われている新生児スクリーニング出の発見頻度と検査法

| 対象疾患 | 発見頻度 | 便益性** | 検査法 |
|--------------------------------|------------------------|-------|----------------------------|
| 1. フェニルケトン尿症 (ビオプテリン欠乏症) | 1 : 7~8万 (1 : 158万) | ○ | ガスリー法, 酵素法, HPLC, (タンデムマス) |
| 2. メープルシロップ尿症 | 1 : 50万 | △ | |
| 3. ホモシスチン尿症 | 1 : 80万 | △ | |
| 4. ガラクトース血症* (トランスフェラーゼ欠損症) | 1 : 3.2万 (1 : 80万) | △ | ボイトラー法, ペイゲン法, 酵素法 |
| 5. クレチン病 | 1 : 2,100 | ◎ | 酵素法 |
| 6. 先天性副腎過形成症 | 1 : 1.6万 | ○ | 酵素法 |

*ガラクトース高値は約3.2万人に1人の頻度で発見されるが, ガラクトース代謝酵素自体の欠損よりも, 乳児肝炎, 門脈形成異常, シトリン欠損症などともなう2次性疾患が多く発見される。本来のスクリーニング目的のトランスフェラーゼ欠損症は約80万人に1人の頻度。 **便益性の欄は, ◎=便益性がきわめて良好, ○=良好, △=便益性はあまり良くない。

動きがある。最近ではタンデムマスを導入して, 有機酸, 脂肪酸代謝異常症などにも対象疾患を広げることが検討されている。一方対象疾患は, 一般小児科医でもなじみのないような稀少疾患が多いので, 診療支援ネットワーク作り, 医療費などの支援, 患者フォローアップ体制等の充実が必要である。

2 先天代謝異常症

① 先天代謝異常の分類

酵素欠損のために体内に増加する代謝産物によって表2-2のように分類される。アミノ酸が上昇すれば「アミノ酸代謝異常」, 有機酸が上昇すれば「有機酸代謝異常」, 脂質が蓄積すれば「リピドーシス」などと分類される。

② 先天代謝異常の主な臨床徴候

中枢神経障害, 発育障害, 嘔吐, 下痢, 肝腫大, 特異な顔貌, 骨格異常, 筋肉症状, 急性脳症, 突然死, 白内障, 眼底異常, 皮膚毛髪 of 異常などがある。症状は疾患によって異なり, 重症度に個人差もある。

一般検査所見としては, 肝機能障害, 低血糖, 高アンモニア血症, 代謝性アシドーシス, 好中球減少, あるいは骨X線異常所見などがみられる。

③ 先天代謝異常の診断

病歴, 臨床症状, あるいは一般的検査の他に, 特異的診断法として, アミノ酸分析, 有機酸分析, タンデムマス検査, 脂質分析, 酵素活性測定, あるいは遺伝子診断などが行われる。

表2-2 主な先天代謝異常の分類

| 分類 | 異常を示す主な代謝産物 | 代表的な疾患 |
|-------------|------------------------|----------------------------------|
| 1) アミノ酸代謝異常 | アミノ酸 | フェニルケトン尿症、メープルシロップ尿症、ホモシスチン尿症など |
| 2) 有機酸代謝異常 | 有機酸 | メチルマロン酸血症、プロピオン酸血症、イソ吉草酸血症 |
| 3) 脂肪酸代謝異常 | 脂肪酸 | 中鎖アシル-CoA脱水素酵素(MCAD)欠損症、CPT欠損症など |
| 4) 脂質代謝異常 | コレステロール、中性脂肪、リン脂質など | 高脂血症、リポドーシス(ゴーシェ病、ファブリー病など) |
| 5) ムコ多糖症 | ムコ多糖類 | ハーラー症候群、ハンター症候群、モルキオ病など |
| 6) 糖質代謝異常 | グリコーゲン、ガラクトース、フルクトースなど | 糖原病、糖新生系異常症、ガラクトース血症など |
| 7) 金属代謝異常 | Cuなど | ウィルソン病、メンケス病など |
| 8) 核酸代謝異常 | プリン、ピリミジン | レッシュナイハン症候群、アデノシンでアミナーゼ欠損症など |

④ 先天代謝異常の治療

① 蓄積物質の軽減

欠損部位の上流の栄養分の摂取を制限して蓄積物質を軽減する。フェニルケトン尿症のフェニルアラニンの制限食などがある。

② 欠乏物質の補充

代謝障害部位の下流で欠乏する物質を補充する。例えば悪性高フェニルアラニン血症に対して、障害部位の下流で欠乏するL-ドーパ等を補充する。

③ ビタミン大量投与

補酵素であるビタミンが欠損酵素を回復させることがある。例えば、B12反応性メチルマロン酸血症などがある。

④ 蓄積物質の除去

蓄積物質を体内から除去して毒性を軽減する。例えば、ウィルソン病では、キレート剤を投与して蓄積した銅を排出させる。

⑤ その他の治療

骨髄移植、酵素補充療法、遺伝子治療などがある。またマススクリーニングによる発症予防も重要な治療対策である。

⑤ アミノ酸代謝異常

① フェニルケトン尿症

フェニルアラニンからチロシンに代謝する酵素の先天性欠損のために、

血中フェニルアラニン濃度が上昇し脳障害を来す。生後数か月からけいれん、発達遅滞が現れる。新生児マススクリーニングで早期発見して、フェニルアラニンの少ない食事療法を始めることによって知能障害を予防できる。

●発展 マターナルPKUとは

新生児マススクリーニングによってフェニルケトン尿症(PKU)患者が障害なく成人し、結婚して子どもをもうけることができるようになった。PKU患者が妊娠したとき、胎児は病気でないのにフェニルアラニン高濃度にさらされると、知能障害、小頭症、心疾患を持った子どもが生まれることがある。これをマターナルPKUという。この予防として、妊娠前からの嚴重なフェニルアラニン濃度の管理が重要である。

② メープルシロップ尿症

分枝鎖アミノ酸(ロイシン, バリン, イソロイシン)の代謝過程で分枝アミノ酸 α ケト酸脱水素酵素が欠損しているため、上記の分枝鎖アミノ酸と α ケト酸類が上昇する。症状はケトアシドーシス, 低血糖発作などで、重篤な例では生命の危険がある。治療は食事療法(分枝鎖アミノ酸の制限食)である。

③ ホモシスチン尿症

メチオニン, ホモシステインからシスタチオニンを合成する酵素が欠損するためにメチオニン, ホモシステインが上昇し、尿中にホモシスチンが増加する疾患である。症状は、高身長, クモ状指, 水晶体脱臼, 知能障害などである。治療は、食事療法, ビタミンB₆大量投与, ベタイン投与などである。

⑥ 有機酸代謝異常

① メチルマロン酸血症

バリン, イソロイシンの中間代謝過程で、メチルマロン酸を代謝する酵素の欠損のためにメチルマロン酸が体内に増加する。乳児期早期から、哺乳不良, 多呼吸, けいれんなどの急性症状で発症することが多い。治療は、食事療法, カルニチン投与などである。

② プロピオン酸血症

メチルマロン酸のすぐ上の代謝経路の酵素が欠損するために体内にプロピオン酸が増加する疾患である。症状, 治療は、メチルマロン酸血症と同様である。

③ イソ吉草酸血症

ロイシンの中間代謝過程での酵素欠損のために、イソ吉草酸が増加す

る。症状は乳児期早期から哺乳不良，多呼吸，けいれん，汗臭い体臭などである。治療は，食事療法，カルニチン投与等である。

④ 脂肪酸代謝異常

脂肪酸 β 酸化にかかわる酵素の異常のために， β 酸化によるエネルギーの産生不全に陥る。症状は，ふだん正常にみえながら，感染などのストレスを契機に，突然死，急性脳症を起こす。治療は，長時間の空腹を避けることやカルニチン投与である。

●発展 タンデムマス

アミノ酸代謝異常，有機酸代謝異常，脂肪酸代謝異常を血液ろ紙を使って診断できる質量分析計である。従来のガスリー法に代って，新しいマススクリーニング法として普及しつつある。

⑦ 糖質代謝異常

① ガラクトース血症

ガラクトースの代謝過程の酵素の先天的異常のために，ガラクトースが増加する疾患である。症状は肝不全，白内障などである。治療は，ガラクトース除去，乳糖除去食(治療用特殊ミルクあり)などである。

② 糖原病

食事などからとったブドウ糖は，肝臓か筋肉にグリコーゲンとして蓄積される(図2-1)。そして必要なとき，グリコーゲンを分解してブドウ糖に変えられる。糖原病はグリコーゲンを分解する酵素の欠損によって，肝臓や筋肉にグリコーゲンが蓄積する疾患である。酵素局在によって肝型と筋型がある。最も有名なフォンギルケ病(グルコース-6-リン酸ホスホオリラーゼ欠損症)では，低血糖発作と低身長が主な症状である。治療は低血糖予防，コーンスターチ療法などがある。

⑧ リソソーム病

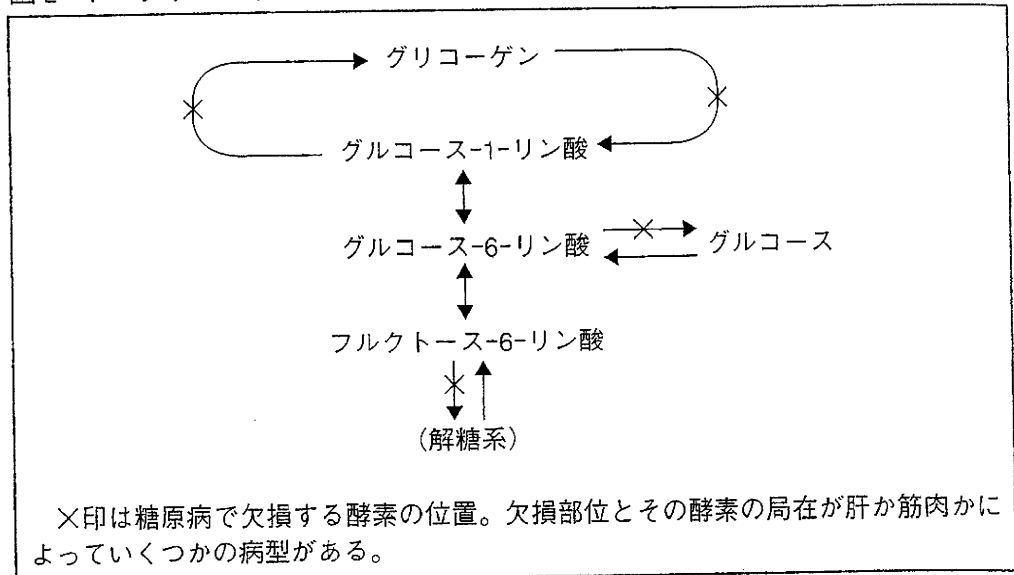
① ムコ多糖症

ムコ多糖を分解するリソソーム酵素の欠損によって，全身，特に骨，結合組織，皮膚などにムコ多糖が蓄積する。ハーラー症候群(1型)，ハンター症候群(2型)などが有名である。特異な顔貌，低身長，骨格異常，発達障害などをきたす。骨髄移植，あるいは酵素補充療法が最近注目されている。

② リピドーシス

リン脂質を代謝するリソソーム酵素の欠損によって，組織に脂質が蓄積する疾患である。グルコセレブロシドの蓄積するゴーシェ病，スフィンゴミエリンの蓄積するニーマンピック病などが有名である。

図 2-1 グリコーゲンの代謝と糖原病, 糖新生異常症



⑨ その他の代謝異常

その他、代表的な先天代謝異常として、肝や中枢神経系に銅が蓄積するウィルソン病や、高コレステロール血症などの家族性高脂血症、あるいは核酸代謝異常のレッシュナイハン症候群などがある(表 2-2 参照)。

③ 糖尿病 diabetes mellitus

① 子どもの糖尿病の特徴と疫学

糖尿病とは、インスリンの作用不足によって起こる、糖代謝異常である。インスリンが絶対的あるいは相対的に不足することにより、細胞内で糖をエネルギーとして利用することができず血管内に蓄積し、慢性的な高血糖の状態となる。

小児では I 型糖尿病が多いとされてきたが、近年、学校検尿や肥満児検診の普及により、II 型糖尿病も多く発症していることが明らかとなった。日本における発症率は以下の通りである。

<発症率>

- ① I 型糖尿病：10万人当たり約 2 人
- ② II 型糖尿病：小学生…10万人当たり 2 人
中学生…10万人当たり 13.9 人

② 糖尿病の種類とその症状・治療

インスリン作用不足が生じる病態は、大きく 2 つに分類される。

① I型糖尿病

何らかの原因によって、インスリンを分泌する膵β細胞が破壊され、絶対的なインスリン不足となり発症する。インスリン注射による治療が必須となる。原因として自己免疫性、特発性などがある。

インスリンがまったく分泌されないことから、食事によって吸収した糖をエネルギーとして利用することができず、血液中にあふれて高血糖を示す。血中にあふれた糖は尿糖として多量の水分とともに尿中に排泄される。その結果、口渇・多飲・多尿、体重減少、全身倦怠感などの症状を呈するようになる。また、エネルギーとして糖を利用することができないため、脂肪や蛋白質をエネルギーとして使用する。脂肪分解が増えた結果、ケトン体が血中に増加し、ケトン尿が出現、血液が酸性に傾くケトアシドーシス(ketoacidosis)を呈するようになる。ケトアシドーシスを代償するために、過換気(クスマウル Kussmaul 呼吸)を認めることもある(図2-2)。

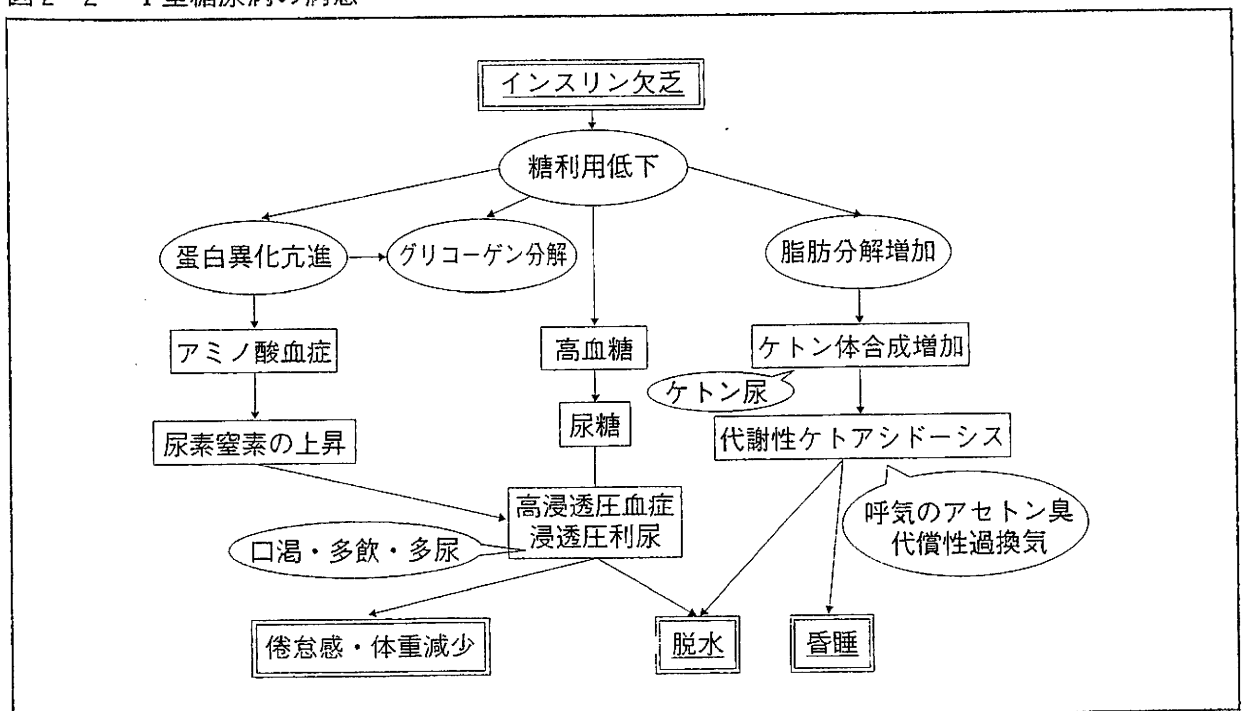
② II型糖尿病

膵β細胞の機能はある程度保たれているが、インスリン分泌が低下していたり、細胞や臓器のインスリン感受性が低下していたりすることにより、相対的なインスリン不足となり発症する。高血糖による症状として、口渇・多飲・多尿、体重減少などを認める。小児のII型糖尿病では、肥満と高インスリン血症を伴うことが多い。

③ 糖尿病の治療

小児期に発症した糖尿病における治療目標は、正常な成長・発達が保た

図2-2 I型糖尿病の病態



れること、急性・慢性合併症を予防すること、健常児と同様のQOLを保つこととされている。

I型糖尿病に対する治療の基本は、血糖測定と頻回のインスリン自己注射による血糖の自己管理である。

II型糖尿病では、食事・運動療法が治療の基本となる。食事・運動療法をきっちり行っているにもかかわらず、血糖コントロールが悪化する場合には、経口血糖降下剤などが投与されることもある。

③ 糖尿病の生活指導

① インスリン自己注射

インスリン製剤は、その作用時間の違いから、超速効型、速効型、中間型、遅効型、超遅効型に分類される。また、作用の早いものと遅いものを2種類混ぜた混合製剤もある。発症年齢や生活様式に合わせて、できるだけ正常に近い血糖を維持できるようにインスリン自己注射を行う。

- 発展** I型糖尿病に対するインスリン自己注射の基本型として、食前に超速効型あるいは速効型を、就寝前に中間型を注射する4回法や、朝・夕食前に混合製剤を注射する2回法がある。しかし、よりよい血糖コントロールを得て、かつQOLを向上させるためには、患児一人ひとりの生活に合わせて使用するインスリン製剤を選択し、注射回数を設定する。

② 食事指導

I型糖尿病の場合もII型糖尿病の場合も、肥満を伴わない児に対しては、基本的な栄養学的知識を提供するだけでよい。バランスのよい食事を摂り、適切な身体の発育を確保し、肥満を防ぎ、かつ良好な血糖コントロールを維持することが目標となる。

肥満を伴う児に対しては、各年齢における栄養所要量の80~90%を目標とする。特にII型糖尿病では、自覚症状に乏しく治療を中断しやすいことを考慮し、厳格な食事制限は行わない。食事指導では、まず、いつ何をどのように食べているのか、食べ過ぎているとすればどのような状況で起こっているのかなどを明らかにし、肥満を引き起こしている原因を解決できるように指導する。

③ 糖尿病の合併症

糖尿病の合併症には、急性合併症と、経過中に徐々に進行する慢性合併症がある。

a. 急性合併症

高血糖によるもの(糖尿病性ケトアシドーシス、高浸透圧性非ケトン性昏睡)と、低血糖によるものがある。高浸透圧性非ケトン性昏睡は小児で

はまれな病態である。生命の危機に陥る場合もあり、患者に対する教育・指導、医療スタッフとの緊急連絡体制の調整が予防対策として重要である。

糖尿病性ケトアシドーシス (diabetic ketoacidosis)：初発時にみられることが多いが、経過中にもみられる。経過中に糖尿病性ケトアシドーシスを起こす原因として、インスリン注射の中断、感染症罹患時の過度なインスリン減量、ストレスなどがある。

低血糖 (hypoglycemia)：インスリンの過剰投与、食事の遅れ、運動によるエネルギーの消費などによって起こる。低血糖の症状を(図2-3)に示す。これらの症状は、一定の血糖値になれば必ず現れるものではなく、血糖はあまり低くないのに症状が出現したり、逆に、低くても無症状である場合もある。また、人によって現れやすい症状が異なる。

b. 慢性合併症

血糖値のコントロールが悪く、慢性的な高血糖の状態が続くと、血管の変化が進み、目の網膜(糖尿病性網膜症)、腎臓(糖尿病性腎症)、神経(糖尿病性神経障害)などで障害が起こる。合併症の多くは、進行するまで症状が現れず、早期発見するためには、定期的な検診が重要である。また、合併症を発症しても、早期で軽症な場合は血糖コントロールをよくすることによって、症状が改善したり消失したりすることも少なくない。

●発展 糖尿病性網膜症

早期発見・早期治療が重要なポイントとなる。眼科医による定期的な検診が必要である。

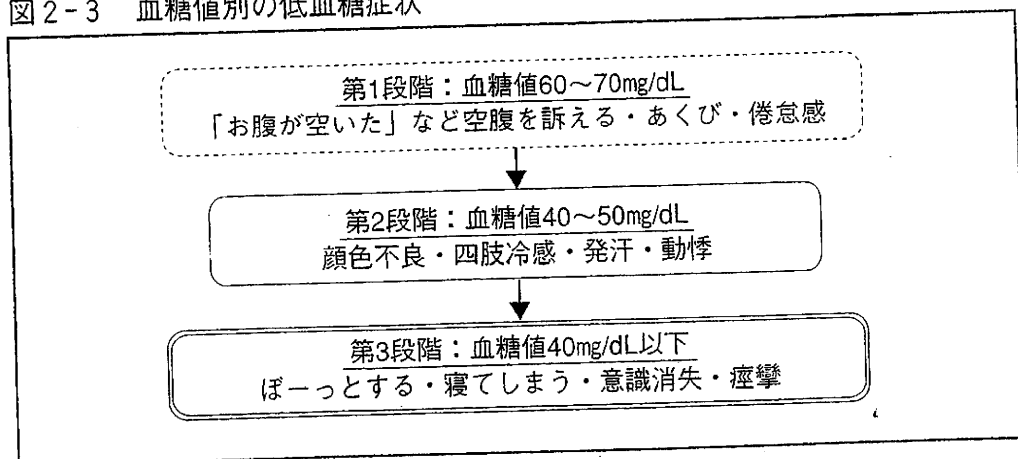
糖尿病性腎症

糖尿病性腎症の最初の兆候は、尿中の微量アルブミン尿の増加である。尿中アルブミン定量を含めた定期的な尿検査が大切である。

糖尿病性神経障害

糖尿病の合併症の中で最も頻度が高く、発症時期が早く、かつ診断と治療が難しいとされる。代表的な自覚症状として、「手足のしびれ」

図2-3 血糖値別の低血糖症状



がある。自律神経が障害されると、立ちくらみ、胃無力症、下痢・便秘、排尿障害、発汗障害などの症状がみられることがある。他覚的所見としては、アキレス腱反射の消失、振動覚異常などを認める。

④ 脱 水

① 小児の体液調節の特徴

生体を構成する細胞が正常に機能するためには、電解質、酸塩基平衡(pH)、浸透圧など体液環境が一定に保たなければならない。生体は、常に水や電解質などの出入りを調節し、安定した状態を保っている。しかし、そのバランスはデリケートなものであり、特に小児では、体液環境のバランスが成人よりも崩れやすく、脱水や電解質異常が起りやすい。

以下の点が小児における体液調節の特徴である。

成人と比較すると、

- (1) 体重当たりに占める水分の割合が高い(総論8. 治療 ②輸液療法の基本の項を参照)。
- (2) 体重当たりの必要水分量が多く、体重当たりの1日の水分代謝回転が速い。
- (3) 不感蒸泄量が多い。
- (4) 腎機能が未熟であり、基本的な尿濃縮力が低く、変化に対応する予備能も少ない。
- (5) 病的状態下で摂取する水分量の低下、排泄の増加が起りやすい。

- 発展** 体内の水分は、細胞内に存在するものを細胞内液、細胞外に存在するものを細胞外液(血漿や組織液)に分類される。小児では、細胞外液が成人と比較して多いため、全体の水分量も多くなっている(総論8. 治療 ②輸液療法の基本の項を参照)。また、成人では1日の水の出入りが細胞外液量の約5分の1であるのに対し、乳児では約2分の1である。細胞外液は、嘔吐・下痢、発汗などの影響を受けやすい。腎機能も未熟であるため、脱水や水負荷に対する予備能がない。これらの理由から、小児は脱水あるいは溢水の状態に陥りやすい。

② 脱水の重症度評価とケア

① 脱水の重症度評価

脱水とは、下痢や嘔吐などにより体内から水分が失われる、あるいは、摂取水分量が不足することによって体内の水分量が欠乏した状態をいう。

病態を把握するために、病歴(嘔吐・下痢の性状、哺乳量・食事量、体重の変化など)を聞き取り、身体所見(意識状態、顔つき、皮膚や粘膜の状態、

尿量、バイタルサイン(呼吸・頻脈・血圧・体温)などを詳しく観察し、脱水の重症度を評価することが重要である(表2-3)。

② 脱水のケア

軽症の脱水症および中等症の脱水症の一部に対する治療には、経口補液剤による経口補液療法が効果的である。経口補液療法を適切に行えば、経静脈輸液を必要とする頻度を減らすことができる。経口補液療法では、症状が改善しない場合もあるため、脱水症状が消失するまで観察しなければならない。

重症の脱水症、経口補液療法を行っても症状が改善しない中等症の脱水症に対しては、経静脈輸液療法が必要である。輸液療法を開始した後、意識状態、全身状態、心拍数、血圧、脈拍などを定期的にモニターしなければならない。脱水の状態を頻回に評価し、輸液療法が適切に行われているかどうかを判断する必要がある。

- 発展** 経口補液療法には、(i)生理的な方法で水・電解質・糖の補給ができる、(ii)外来や家庭での治療が可能、という利点がある反面、(i)管理が不十分になる、(ii)適切な量を服用できない可能性がある、という欠点もある。また、(i)悪心・嘔吐が強い、(ii)意識障害がある、(iii)6か月未満の乳児、(iv)重症脱水症の場合には適さない治療法である。

小児の脱水症の際に与える経口補液剤としては、Na濃度40~60mEq/Lブドウ糖濃度50~111mM/Lであり、血液の浸透圧よりも低い

表2-3 脱水の評価

| | 最小限の脱水または脱水なし (体重の3%未満の喪失) | 軽度~中等度の脱水 (体重の3~9%の喪失) | 重度の脱水 (体重の9%を超える喪失) |
|-------|-------------------------------|---------------------------------|------------------------|
| 意識状態 | 良、覚醒している | 正常だが、少しぐったりしている、または落ち着きがない、易刺激性 | 傾眠、感覚鈍磨、意識不明 |
| 心拍数 | 正常 | 正常~増加 | 頻脈 |
| 脈の状態 | 正常 | 正常~減弱 | 弱い、あるいは脈が触れない |
| 呼吸 | 正常 | 正常~少し速い | 深い |
| 尿量 | 正常~減少 | 減少 | 最小限度 |
| 口渇 | 通常と同じように水を飲む | 口渇あり。水分を欲しがる | ほとんど水を飲まない。飲むことができない |
| 眼 | 正常 | わずかに落ちくぼむ | 深く落ちくぼむ |
| 涙 | あり | 減少 | なし |
| 口腔内・舌 | 湿っている | 乾燥している | 乾ききっている |
| 皮膚 | しわはすぐに元に戻る | しわは2秒未満で元に戻る | しわが元に戻るのに2秒以上かかる |
| 四肢 | 暖かい | 冷たい | 冷たい、チアノーゼあり |

(出典：Morbidity and Mortality Weekly Report Vol. 52. 2003改変)

(200~250mOsm/kg)ものが吸収されやすく、適切であるとされている。乳幼児用のイオン飲料やスポーツドリンクは、推奨されている経口補液剤の組成と比較すると、Na濃度が低く、ブドウ糖濃度や浸透圧が高くなっており、水、Naの吸収の点で劣っている(参照：総論8. 治療 2. 輸液療法の基本)。

③ 体液の電解質，酸塩基平衡

① 電解質

細胞内液・細胞外液の電解質には、陽イオンと陰イオンが存在する。血漿では、陽イオンとしてナトリウムイオン(Na^+)、陰イオンとして塩素イオン(Cl^-)と重炭酸イオン(HCO_3^-)が、細胞内液では陽イオンとしてカリウムイオン(K^+)、陰イオンとしてリン酸イオン(HPO_4^-)と蛋白質が主な組成成分となり、電解質のバランスが保たれている(総論8. 治療 ②輸液療法の基本図8-1参照)。

② 酸塩基平衡


血液は、 $\text{pH}7.4 \pm 0.05$ に調節され、酸塩基平衡が保たれている。酸塩基平衡(pH)を調節しているのは腎臓と肺である。腎臓では、重炭酸イオン(HCO_3^-)を再吸収、水素イオン(H^+)を分泌することによって、肺では二酸化炭素分圧(PCO_2)を換気量によって調節している。

●発展 アシドーシス(acidosis)とアルカローシス(alkalosis)

アシドーシスとは、血液を酸性にするような病態を指し、アルカローシスは、血液をアルカリ性にするような病態を指す。腎臓の障害や細胞での代謝機能障害により HCO_3^- が変化して起こる場合は「代謝性」、肺の障害により PCO_2 が変化して起こる場合は「呼吸性」と分類される(表2-4)。

表2-4 酸塩基平衡の分類

| | pH変化の原因 | 分類 |
|----------------|---|------------------------------|
| 酸性(pHの低下) < | 重炭酸イオン(HCO_3^-)の減少 二酸化炭素分圧(PCO_2)の上昇 | : 代謝性アシドーシス : 呼吸性アシドーシス |
| アルカリ性(pHの上昇) > | 重炭酸イオン(HCO_3^-)の増加 二酸化炭素分圧(PCO_2)の低下 | : 代謝性アルカローシス : 呼吸性アルカローシス |



ナースと コメディカルのための 小児科学

編集

聖路加看護大学大学院客員教授
神戸大学大学院保健学研究科教授

白木 和夫
高田 哲

Pediatrics for nurses and comedicals

2010年3月
全419ページ



Death effector domain–containing protein (DEDD) is required for uterine decidualization during early pregnancy in mice

Mayumi Mori,¹ Miwako Kitazume,¹ Rui Ose,² Jun Kurokawa,¹ Kaori Koga,³ Yutaka Osuga,³ Satoko Arai,¹ and Toru Miyazaki¹

¹Laboratory of Molecular Biomedicine for Pathogenesis, Center for Disease Biology and Integrative Medicine, Faculty of Medicine, The University of Tokyo, Bunkyo-ku, Tokyo, Japan. ²Department of Human Genome Research, Kazusa DNA Research Institute, Kisarazu, Chiba, Japan. ³Department of Obstetrics and Gynecology, Faculty of Medicine, The University of Tokyo, Bunkyo-ku, Tokyo, Japan.

During intrauterine life, the mammalian embryo survives via its physical connection to the mother. The uterine decidua, which differentiates from stromal cells after implantation in a process known as decidualization, plays essential roles in supporting embryonic growth before establishment of the placenta. Here we show that female mice lacking death effector domain–containing protein (DEDD) are infertile owing to unsuccessful decidualization. In uteri of *Dedd*^{-/-} mice, development of the decidual zone and the surrounding edema after embryonic implantation was defective. This was subsequently accompanied by disintegration of implantation site structure, leading to embryonic death before placentation. Polyploidization, a hallmark of mature decidual cells, was attenuated in DEDD-deficient cells during decidualization. Such inefficient decidualization appeared to be caused by decreased Akt levels, since polyploidization was restored in DEDD-deficient decidual cells by overexpression of Akt. In addition, we showed that DEDD associates with and stabilizes cyclin D3, an important element in polyploidization, and that overexpression of cyclin D3 in DEDD-deficient cells improved polyploidization. These results indicate that DEDD is indispensable for the establishment of an adequate uterine environment to support early pregnancy in mice.

Introduction

Approximately 10%–15% of couples experience infertility during their reproductive years, owing mainly to implantation failure. Among the reasons underlying such failure, defective development of functional decidua at the implantation site within the uterus has recently been highlighted (1–3). In response to implantation, stromal cells immediately surrounding the mucosal crypt where the embryo is embedded proliferate extensively and undergo differentiation into polyploid decidual cells, forming an avascular primary decidual zone, followed by a broad, well-vascularized secondary decidual zone. It is believed that this decidual structure is important for the provision of nutrition to the developing embryo and also acts as a barrier against uncontrolled trophoblast proliferation until the placenta develops. Analyses of mutant mice that show female infertility, such as in knockout mice for homeobox A10 (*Hoxa10*) (4, 5) or IL-11 receptor (6), have contributed to the investigation of the molecular mechanisms involved in decidualization. Recent evidence has implicated cell-cycle regulation as being essential for both the proliferation and differentiation of stromal cells. In particular, Das and colleagues reported that cyclin D3-dependent activation of cyclin-dependent kinase 4 (Cdk4) or Cdk6 appears to be involved sequentially in those two events during decidua formation (7). In addition to these essential elements, in this report, we present data indicating that the death effector domain–containing (DED–containing) protein DEDD is indispensable for the maturation of decidual cells and support of female fertility in mice.

We previously found that the DEDD protein, initially described as a member of the DED–containing protein family, is associated with the Cdk1/cyclin B1 complex, thereby decreasing the kinase activity

of Cdk1 (8). This response impedes Cdk1-dependent mitotic progression, preserving synthesis of ribosomal RNA (rRNA) and protein and resulting in sufficient cell growth before cell division (8, 9). Consistently, depletion of DEDD results in a shortened mitotic duration, an overall decrease in the amount of cellular rRNA and protein, and decreased cell and body size (8, 9). In addition to the function of DEDD as a cell-cycle regulator, we recently determined that DEDD associates with S6K1 (10) and Akt (11), major elements of the signaling cascade involving mitogen-related PI3K. Such associations support the roles of S6K1 activity and Akt protein stability, respectively, in contributing to the maintenance of glucose homeostasis in the body (10, 11). Hence, DEDD is multifunctional and is involved in different physiological mechanisms. In fact, we found that female *Dedd*^{-/-} mice are infertile, and embryos of all DEDD genotypes die during early pregnancy within the *Dedd*^{-/-} uterus, whereas *S6K1*^{-/-} female mice, which also show a similar small phenotype and attenuated glucose homeostasis, show normal fertility (12). Given the phenotypic similarity of *Dedd*^{-/-} mice to other infertile mutant mice (4–6), this observation led us to address whether DEDD might also be involved in uterine decidualization.

In the present study, we assessed embryos implanted in *Dedd*^{-/-} uteri. In addition, we analyzed the maturation state of uterine decidual cells from *Dedd*^{-/-} mice in vitro and in vivo. We also studied the molecular mechanism underlying the inefficient decidualization of *Dedd*^{-/-} cells.

Results

Female *Dedd*^{-/-} mice are infertile. We found that *Dedd*^{-/-} female mice exhibited complete sterility when mated with males of any genotype (*Dedd*^{-/-}, *Dedd*^{+/-}, or *Dedd*^{+/+}), although *Dedd*^{-/-} offspring were born from the intercross of *Dedd*^{-/-} mice at a Mendelian ratio, and

Conflict of interest: The authors have declared that no conflict of interest exists.

Citation for this article: *J Clin Invest.* 2011;121(1):318–327. doi:10.1172/JCI44723.



Table 1
Female *Dedd*^{-/-} mice are infertile

| Genotype | | Offspring | | | Sum | n | Birth rate |
|----------|------|-----------|-----------|----------|-----|----|------------|
| Female | Male | +/+ | +/- | -/- | | | |
| +/+ | +/- | 13 (46%) | 15 (54%) | 0 (0%) | 28 | 6 | 4.67 |
| +/+ | -/- | 0 (0%) | 87 (100%) | 0 (0%) | 87 | 18 | 4.83 |
| +/- | +/+ | 24 (51%) | 23 (49%) | 0 (0%) | 47 | 10 | 4.70 |
| +/- | +/- | 108 (30%) | 183 (51%) | 66 (19%) | 357 | 65 | 5.49 |
| +/- | -/- | 0 (0%) | 47 (64%) | 27 (36%) | 74 | 17 | 4.35 |
| -/- | +/+ | 0 | 0 | 0 | 0 | 23 | 0.00 |
| -/- | +/- | 0 | 0 | 0 | 0 | 37 | 0.00 |
| -/- | -/- | 0 | 0 | 0 | 0 | 12 | 0.00 |

The breeding efficiency in male-female combinations of various *DEDD* genotypes was investigated. Sum, total number of newborns; n, number of successful matings (with a vaginal plug); birth rate: sum/n.

Dedd^{-/-} male mice were fertile (Table 1). Mating efficiency was comparable in female *Dedd*^{-/-} mice and female mice of other genotypes, as assessed by vaginal plug formation (data not shown). The uterine *Dedd* mRNA level was upregulated after 4.5 dpc as assessed by quantitative RT-PCR (QPCR) (Figure 1A). An increase in *Dedd* expression was also observed in stromal cells differentiated to mature decidual cells in vitro in the presence of estrogen, progesterone (P4), and heparin-binding EGF-like growth factor (HB-EGF) (Figure 1B). Upregulation of *DEDD* expression along with the decidualization was also detected in human uterine stromal cells (Figure 1C). These results suggested that uterine *DEDD* is important after implantation and that the maturation of uterine decidual cells may be associated with *DEDD* expression.

Consistently, when 4.5-dpc uteri were analyzed with injection of blue dye (1% Chicago blue solution) (13), the number of implantation sites was comparable in *Dedd*^{-/-} and *Dedd*^{+/+} mice (6.8 ± 0.73 in *Dedd*^{-/-} mice and 7.4 ± 0.40 in *Dedd*^{+/+} mice; n = 5 each). In addition, the spacing and crowding of implanted embryos in the uterus was also similar in *Dedd*^{-/-} and *Dedd*^{+/+} mice (Figure 1D). Histologic analysis of 4.5-dpc *Dedd*^{-/-} uteri revealed normal embryonic implantation (Figure 1E). No difference was observed in the size of the edematous region and the decidual zone, which are formed in response to implantation (Figure 1E). Immunostaining for COX-2, an implantation site marker (14), corroborated the finding of normal embryonic implantation in *Dedd*^{-/-} and *Dedd*^{+/+} uteri (Figure 1E). Similarly, the mRNA level for *Ptgs2/Cox2* was comparable in *Dedd*^{-/-} and *Dedd*^{+/+} uteri, as assessed by QPCR with total RNA isolated from implantation sites (data not shown). However, anatomical analysis showed that in *Dedd*^{-/-} uteri, the number of living embryos decreased rapidly between 5.5 and 8.5 dpc (Figure 1F). At 9.5 dpc, the period of placenta formation, no living embryos were detected in *Dedd*^{-/-} uteri (Figure 1F). During this period, living embryos in *Dedd*^{-/-} uteri were of smaller size compared with those in *Dedd*^{+/+} uteri, and the difference in average embryo size between these two groups became more prominent at later dpc (Table 2). Thus, whereas implantation occurred normally in *Dedd*^{-/-} uteri, embryos showed growth defects and died by 9.5 dpc, before placenta formation. Note that serum levels of estrogen and P4, as well as mRNA levels for the receptor for each hormone (*Esr1* and *Pgr*, respectively) were similar in *Dedd*^{-/-} and *Dedd*^{+/+} females (Supplemental Figure 1; supplemental material available online with this article; doi:10.1172/JCI44723DS1). Preimplantation uterine histology was also comparable (Supplemental Figure 2). In addition, the proliferation of uter-

ine epithelial and stromal cells as well as expression induction of genes such as *Vegf* and *Lif* in response to estrogen were similar in *Dedd*^{-/-} and *Dedd*^{+/+} ovariectomized mice (Supplemental Figure 3). In addition, histologic ovarian morphology, ovulation, and intrauterine fertilization were normal in *Dedd*^{-/-} females (data not shown).

Defective decidualization and disintegrated structure of the implantation site in Dedd^{-/-} uteri. Histological analysis of 5.5-dpc uteri showed that the size of the decidual zone was smaller in *Dedd*^{-/-} compared with *Dedd*^{+/+} mice (Figure 2A). This was confirmed by immunostaining for the decidual marker tissue inhibitor of metal-

loproteinase 3 (TIMP3) (quantification also shown in Figure 2A) (15). Consistent with these results, mRNA levels for various genes that are highly expressed in decidual cells were decreased in *Dedd*^{-/-} compared with *Dedd*^{+/+} uteri, as assessed by QPCR with total RNA isolated from implantation sites (Figure 2B). Of these, the expression level of P4-sensitive bone morphogenetic protein 2 (*Bmp2*) gene was compromised at 5.5 d.p.c in *Dedd*^{-/-} uteri, whereas that of *Hoxa10*, upstream of *Bmp2* (5, 16, 17), was similar to that in *Dedd*^{+/+} uteri. In addition to the decidual zone, the size of the edematous region surrounding the decidual zone was also decreased in *Dedd*^{-/-} compared with *Dedd*^{+/+} mice (Figure 2A), suggesting that vascular permeability might be reduced in *Dedd*^{-/-} uteri.

Such attenuated development of the decidual zone in *Dedd*^{-/-} uteri was accompanied by disintegrated structure of the implantation site at later phases of pregnancy. At 7.5 dpc, a large proportion of decidual cells exhibited a shrunken shape, and marked bleeding was detected at the edge of the cavity in *Dedd*^{-/-} uteri (Figure 2C). In 8.5-dpc *Dedd*^{-/-} uteri, the structure of the outer wall of the embryonic cavity, which is supported by Reichert's membrane and trophoblastic giant cells (TGCs), had collapsed (Figure 2C), and irregular distribution of TGCs (i.e., invasion of TGCs into inner area of uteri) was more remarkable (Figure 2D). Such inadequate uterine environment may cause infertility in female *Dedd*^{-/-} mice.

Defective polyploidy in Dedd^{-/-} decidual cells. We next assessed the state of polyploidy, a hallmark of mature decidual cells, in *Dedd*^{-/-} and *Dedd*^{+/+} uterine stromal cells undergoing decidualization in vitro in the presence of estrogen, P4, and HB-EGF. As shown in Figure 3A, at days 3 and 7, the proportion of multinuclear cells observed microscopically was more than 50% smaller in *Dedd*^{-/-} cells than in *Dedd*^{+/+} cells. Consistent with this result, analysis of these cells by the flow cytometer after DNA staining revealed a significant decrease in the proportion of cells that possessed more than 4 copies of genomic DNA (indicated as 4n and 8n) in *Dedd*^{-/-} compared with *Dedd*^{+/+} cells (Figure 3B). Similar results were obtained in vivo in cells isolated from 4.5-dpc implantation sites in *Dedd*^{-/-} and *Dedd*^{+/+} uteri by collagenase treatment (Figure 3C). Thus, the defect in decidualization observed in *Dedd*^{-/-} uteri was associated with attenuated terminal maturation with less polyploidy.

In contrast, the proliferative status of uterine stromal cells in response to implantation was not different in *Dedd*^{-/-} and *Dedd*^{+/+} mice, as judged by the comparable cell number isolated from implantation sites at 4.5 dpc (1.08 × 10⁶ ± 0.15 × 10⁶ in *Dedd*^{-/-}